

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIORGIO TORELLI, ADOLFO PINI, RODOLFO MARGARIA

## Interpretazione della curva di dissociazione dell'Hb allo stato di dimero (Interazione extramolecolare)

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 37 (1964), n.1-2, p. 18-24.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1964\\_8\\_37\\_1-2\\_18\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_37_1-2_18_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

*SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Fisiologia.** — *Interpretazione della curva di dissociazione dell'Hb allo stato di dimero (Interazione extramolecolare)* (\*). Nota di GIORGIO TORELLI, ADOLFO PINI e RODOLFO MARGARIA, presentata (\*\*) dal Socio R. MARGARIA.

Ad elevata forza ionica la molecola di emoglobina tende a passare dallo stato di tetrapolimero ( $Hb_4$ ) a quello di dimero ( $Hb_2$ ) (Rossi Fanelli e coll. 1961) [1].

L'equilibrio fra  $Hb_2$  ed ossigeno può venire allora espresso, applicando la legge d'azione delle masse alle reazioni



dalla formula:

$$(1) \quad S = \frac{K_1 P_{O_2} + 2 K_1 K_2 P_{O_2}^2}{2 (1 + K_1 P_{O_2} + K_1 K_2 P_{O_2}^2)}$$

I valori di  $K_1$  e  $K_2$  sono facilmente calcolabili col metodo delle estrapolazioni (Margaria e coll.) [2-3] usufruendo delle equazioni

$$(2) \quad S = \frac{1}{2} K_2 P_{O_2} + \dots$$

$$(3) \quad 1 - S = \frac{1}{2} \frac{1}{K_2 P_{O_2}} + \dots$$

Senonché i valori delle costanti, così calcolati sui dati di Rossi Fanelli e coll. [4] non soddisfano le curve sperimentali.

Questi Autori hanno messo in evidenza un «effetto paradosso», che consiste in un accentuarsi della forma sigmoide della curva di dissociazione quando l'Hb passa dalla condizione di tetrapolimero a dimero, contrariamente a quanto ci si dovrebbe aspettare da una interazione fra soli due emi invece che quattro.

Poiché con l'aumentare della forza ionica aumenta l'interazione intramolecolare (Torelli e coll. 1963) [5], e questa consisterebbe in una inibizione della ossigenazione di un eme sostenuta dalla presenza di un eme ridotto nella stessa molecola, si può supporre che in soluzioni ad elevata forza ionica, necessaria per trasformare l'Hb in dimero, l'interazione aumenti in modo tale che anche emi ridotti di molecole vicine intervengano in misura apprezzabile nell'inibire l'ossigenazione degli emi; si realizzerebbe in tal caso una interazione extramolecolare.

(\*) Dall'Istituto di Fisiologia Umana dell'Università di Milano.

(\*\*) Nella seduta del 10 giugno 1964.

Poiché le prime reazioni di ossigenazione vengono già inibite dall'interazione intramolecolare, l'interazione extramolecolare si renderà particolarmente evidente nella inibizione dell'ultima reazione di ossigenazione e cioè, nel caso della molecola contenente due soli emi, in una diminuzione del valore di  $K_2$ .

L'interazione extramolecolare è non solo tanto maggiore quanto maggiore è la forza ionica, ma anche quanto minore è la distanza media di un eme ridotto da un eme di un'altra molecola di Hb in via di ossigenazione: in tal caso essa diminuirebbe con la saturazione, e conseguentemente il valore di  $K_2$  dovrebbe aumentare con la saturazione fino a raggiungere un valore limite, per l'assenza di interazione, a completa saturazione.

Questo valore può essere calcolato per tutte le saturazioni mediante l'equazione 1, quando il valore di  $K_1$  sia stato previamente determinato a mezzo dell'equazione 2.

Denominando  $K_U$  il valore massimo di  $K_2$ , quale risulta essere ad  $S=1$ , l'interazione extramolecolare, analogamente a quanto è stato fatto per quella intramolecolare, può essere espressa, ad ogni valore di saturazione, dal rapporto

$$m = \frac{K_U}{K_2}$$

#### INTERAZIONE EXTRAMOLECOLARE SULL'Hb DIMERO.

Il calcolo è stato applicato alle curve di dissociazione ottenute da Rossi Fanelli e coll. [4] su una soluzione di Hb<sub>2</sub> in fosfati alla concentrazione 2 M, e da Antonini [6] in fosfati 0,3 M e NaCl 2 M (fig. 1).

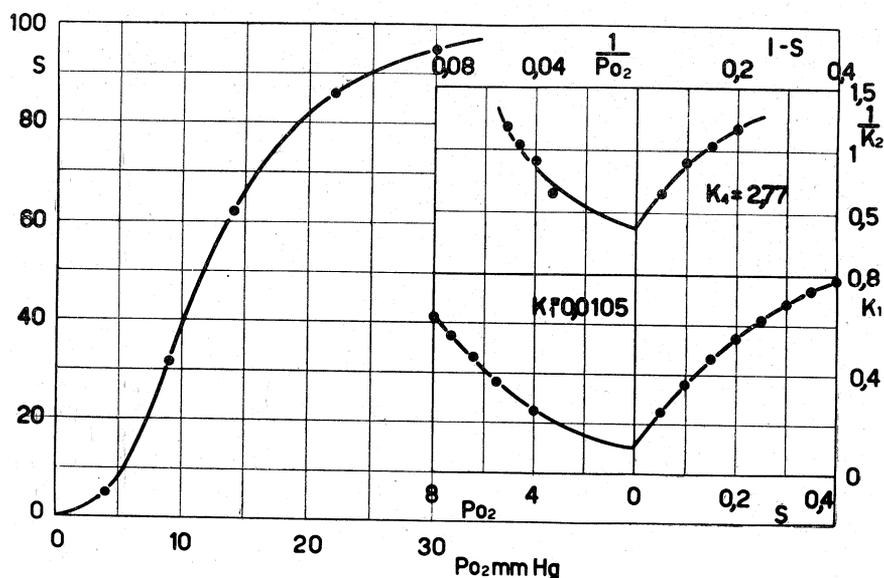


Fig. 1. - Curva di dissociazione di una soluzione di Hb<sub>2</sub> umana (peso molecolare medio  $38 \times 10^3$ ; T 20°; pH 7) in soluzione di fosfati 0,3 M e NaCl 2 M. (Antonini) [6]. Sono anche indicate le estrapolazioni secondo il metodo di Margaria e coll. [2-3] che definiscono il valore di  $K_2$  dalla (2) e di  $K_U$  dalla (1).

Nelle figure 2 e 3 sono illustrate le singole frazioni dei composti intermedi dell'Hb<sub>2</sub> in funzione della saturazione, determinate come è stato descritto da Margaria e coll. [3]; è anche indicato il valore del fattore  $m$ , espressione dell'interazione extramolecolare ai diversi valori di saturazione.

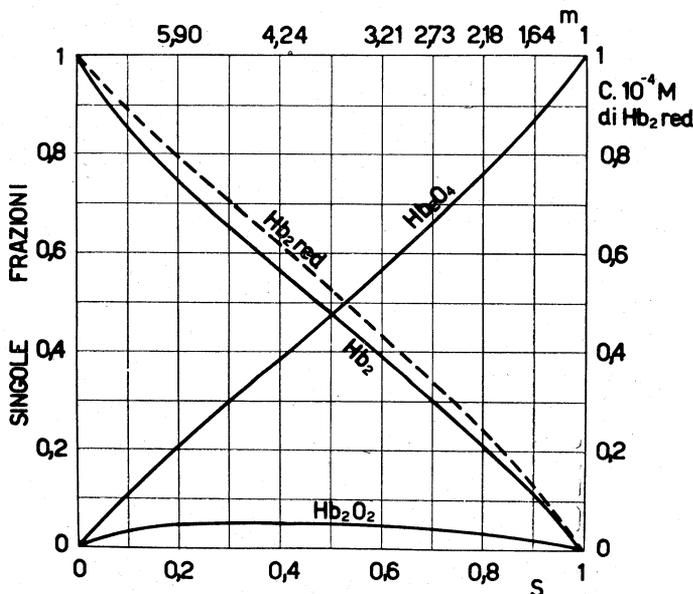


Fig. 2. - Singole frazioni dei composti intermedi dell'Hb<sub>2</sub> in funzione della saturazione ottenute dai dati di Rossi-Fanelli e coll. [4] per una soluzione di emoglobina alla concentrazione in fosfati 2 M.

Sono pure indicati la concentrazione molare di Hb<sub>2</sub> contenente almeno un eme ridotto in funzione della saturazione, ed i diversi valori di  $m$  ai corrispondenti valori di saturazione.

La distanza media tra le molecole in  $m\mu$ ,  $d$ , può essere determinata approssimativamente, partendo dal presupposto che le molecole siano puntiformi, dall'espressione:

$$(4) \quad d = \frac{1}{\sqrt[3]{NC}} \times 10^8 m\mu.$$

Essendo  $N$  il numero di Avogadro e  $C$  la concentrazione molare dell'Hb<sub>2</sub> contenente almeno un eme ridotto.

Nella fig. 4 la distanza media fra le molecole e il valore di  $m$  è posto in funzione della concentrazione di Hb<sub>2</sub> contenente almeno un eme ridotto.

La relazione tra il coefficiente  $m$ , e la distanza  $d$  media fra le molecole è infine rappresentata nel grafico della figura 5.

Entro i limiti di errore dovuto al fatto che non la totalità delle molecole di Hb<sub>2</sub> è scissa in due unità, e trascurando i dati relativi a bassi valori di saturazione, dove l'errore dovuto al presupposto che la molecola sia

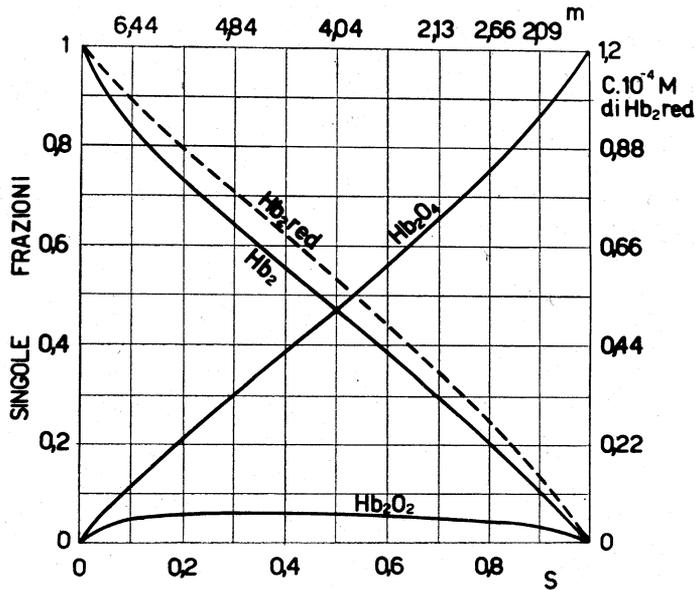


Fig. 3. - Come la precedente per una soluzione di Hb<sub>2</sub> in fosfati 0,3 M e NaCl 2 M (Antonini) [6].

puntiforme è maggiore, la curva della fig. 3 tende ad essere una retta definita dalla equazione  $\log m = \log a - 2 \log d$ , ovvero dalla

$$(5) \quad m = \frac{a}{d^2}$$

ove  $a$  è una costante che dipende dalla forza ionica, ed ha un valore di 3.720 nel caso della soluzione di Hb<sub>2</sub> in fosfati 2 M.

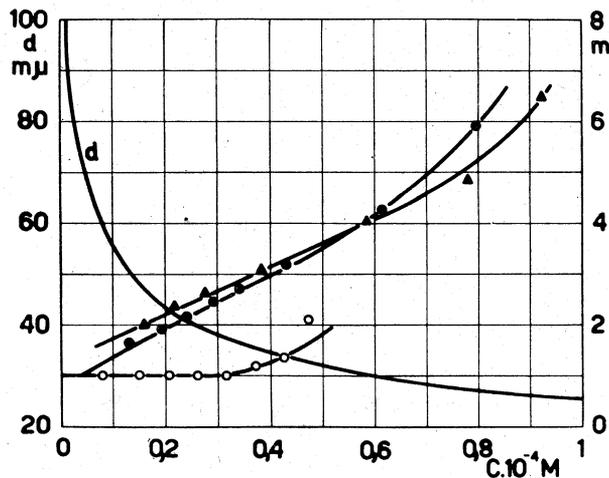


Fig. 4. - Distanza media fra le molecole e valore di  $m$  in funzione della concentrazione di [Hb] contenente almeno un eme ridotto.

- Soluzione di Hb<sub>2</sub> dai dati di Rossi-Fanelli e coll. [4].    △ Soluzione di Hb<sub>2</sub> dai dati di Antonini [6].
- Soluzione di Hb<sub>4</sub> dai dati di Rossi-Fanelli e coll. [4].

Quando l'Hb viene scissa allo stato di dimero in ambiente acido ( $\text{pH} < 4$ ) o basico ( $\text{pH} > 11$ ) il valore  $n$  di Hill tende a diventare prossimo a 2 [7]. La curva di dissociazione dell'Hb<sub>2</sub> diventa cioè meno sigmoide. L'accentuata sigmoidicità della curva di dissociazione del dimero Hb<sub>2</sub> ottenuto, invece che per una forte variazione del pH, per un forte aumento della forza ionica

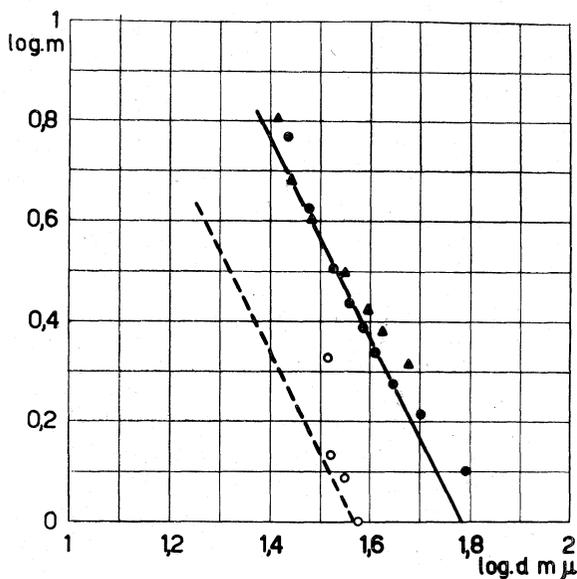


Fig. 5. - Relazione fra il coefficiente  $m$  e la distanza  $d$  per una soluzione in fosfati 2 M (linea continua). La linea tratteggiata è predetta per una concentrazione in fosfati 0,25 M.

● △ ○ Come per la figura precedente.

è quindi presumibilmente l'espressione di un aumento dell'interazione sostenuto dall'elevata concentrazione degli ioni nella soluzione, e non dalla depolimerizzazione della molecola dell'Hb<sub>4</sub>.

#### INTERAZIONE EXTRAMOLECOLARE SULL'Hb TETRAPOLIMERO.

Poiché l'equazione di Adair [8] semplificata [3, 5, 9] non descrive soddisfacentemente la curva di dissociazione per l'O<sub>2</sub> dell'Hb<sub>r</sub> in soluzione di fosfati 0,25 M [5], è stata avanzata l'ipotesi che anche in questa condizione l'interazione estramolecolare entri in gioco.

Con un metodo analogo a quello descritto per l'Hb allo stato di dimero è stata determinata dapprima la relazione esistente fra interazione extramolecolare, espressa dal valore di  $m$ , e la concentrazione dell'emoglobina contenente almeno un eme ridotto (fig. 6) e quindi la relazione fra interazione extramolecolare e distanza media fra molecole interreagenti (fig. 5).

Dalla fig. 6 si rileva che l'interazione extramolecolare assume valori apprezzabili ( $> 1,2$ ) solo a valori di saturazione  $< 0,4$  per valori di concentrazione di molecole di  $Hb_4$  contenente almeno un eme ridotto  $> 0,35 \times 10^{-4}$ .

L'interazione extramolecolare non raggiunge mai in ogni modo valori molto elevati perché è basso il valore di forza ionica.

Poiché passando da un valore di concentrazione in fosfati di 2 M a un valore di 0,25 M,  $\log m$  diminuisce di 0,45 (vedi fig. 4 della precedente comunicazione), la curva della funzione (5) per una concentrazione di fosfati di 0,25 M si dovrebbe trovare spostata in basso di questo valore rispetto a quella corrispondente alla soluzione di  $Hb_2$  in concentrazione 2 M di fosfati.

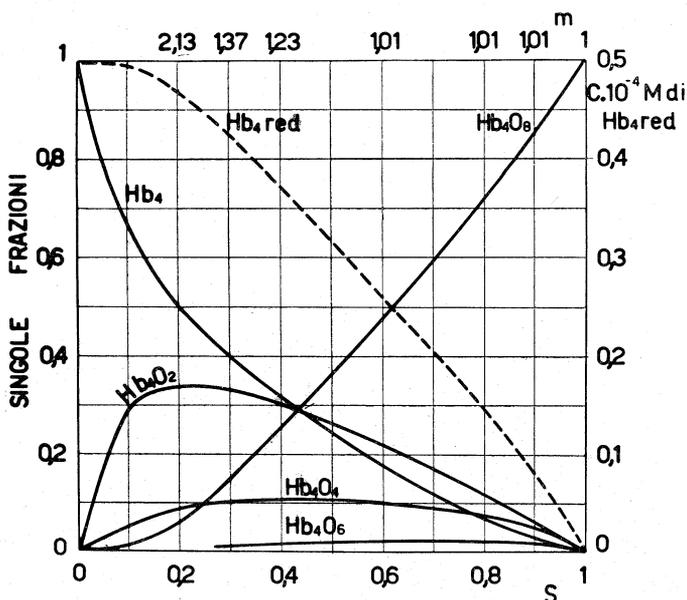


Fig. 6. - Come le figure 2 e 3 per  $Hb_4$  in soluzione di fosfati 0,25 M (Rossi-Fanelli e coll.) [4].

Dai dati sperimentali raccolti in fig. 5 risulta che questo è effettivamente l'ordine di grandezza della variazione. Questi dati paiono indicare che la funzione (5) si applichi quindi anche a più bassi valori di concentrazione ionica.

In conclusione sia l'interazione intra che extra-molecolare sembrano dipendere dalla forza ionica. L'interazione extramolecolare risulta inoltre essere inversamente proporzionale al quadrato della distanza tra l'eme in questione e un eme ridotto.

Questo rilievo suggerisce l'ipotesi che l'interazione sia legata ad una variazione del campo elettrico provocato dalla vicinanza di un eme ridotto.

## BIBLIOGRAFIA.

- [1] ROSSI-FANELLI, E. ANTONINI e A. CAPUTO, « J. Biol. Chem. », 236, 391 (1961 a).
- [2] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Acc. Naz. Lincei », 32, 606 (1962).
- [3] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Exp. Med. Surg. », 21, 127 (1963).
- [4] A. ROSSI-FANELLI, E. ANTONINI e A. CAPUTO, « J. Biol. Chem. », 236, 397 (1961 b).
- [5] G. TORELLI, A. PINI e R. MARGARIA, « Acc. Naz. Lincei » precedente nota (1964).
- [6] E. ANTONINI, Comunicazione personale (1962).
- [7] E. ANTONINI, J. WYMAN, A. ROSSI FANELLI, e A. CAPUTO, « J. Biol. Chem. », 237, 1773 (1962).
- [8] G.S.I. ADAIR, « J. Biol. Chem. » 63, 529 (1925).
- [9] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI « Acc. Naz. Lincei », 32, 831 (1962).